

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-219894
(43)Date of publication of application : 27.09.1991

(51)Int.Cl. C12P 21/08
C12N 5/20
C12N 15/06
// A61K 39/395
G01N 33/53
G01N 33/577
(C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 02-015090 (71)Applicant : KISHIMOTO CHUZO
(22)Date of filing : 26.01.1990 (72)Inventor : KISHIMOTO CHUZO

(54) ANTIBODY AGAINST GP130 PROTEIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable to prepare the subject antibody useful as a diagnostic or treating agent by culturing a hybridoma originated from a mammalian cell immunized with a gp130 protein antigen relating with the signal transmission of human interleukin-6 (IL-6).

CONSTITUTION: A mouse, etc., is immunized with an animal cell (e.g. human IL-6) receptor or myeloma cell strain U266 producing the gp130 protein) as an immunogen, and the splenic cell of the immunized mouse, etc., is fused with a myeloma cell to prepare a fused cell (A). A strain recognizing the gp130 protein is cloned from the cell A to provide a hybridoma (B). The strain B is cultured and the supernatant of the cultured solution is subjected to a separation treatment to provide a gp130 protein-resistant antibody which combines with the IL-6 receptor in the presence of IL-6 but does not combine with the IL-6 receptor in the absence of the IL-6 and which exhibits an apparent molecular weight of 130kDa by a SDS-polycrylamide gel electrophoretic method and combines specifically with the gp130 protein.

⑫ 公開特許公報 (A) 平3-219894

⑬ Int. Cl.

C 12 P 21/08
 C 12 N 5/20
 15/06
 // A 61 K 39/395
 G 01 N 33/53
 33/577
 (C 12 P 21/08
 C 12 R 1:91)

識別記号

府内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)9月27日

D 8829-4C
 U 8829-4C
 D 7906-2G
 P 7906-2G
 B 9015-2G

7236-4B C 12 N 5/00
 8717-4B 15/00

B

C

審査請求 未請求 請求項の数 12 (全7頁)

⑮ 発明の名称 gp130蛋白質に対する抗体

⑯ 特願 平2-15090

⑰ 出願 平2(1990)1月26日

特許法第30条第1項適用 平成元年10月20日、日本免疫学会発行の「日本免疫学会総会・学術集会記録第19巻」に発表

⑱ 発明者 岸本 忠三 大阪府富田林市中野町3丁目5番31号

⑲ 出願人 岸本 忠三 大阪府富田林市中野町3丁目5番31号

⑳ 代理人 弁理士 青木 朗 外4名

明細書

1. 発明の名称

gp130蛋白質に対する抗体

2. 特許請求の範囲

1. ヒトインターロイキン-6のシグナル伝達に関与する次の性質を有する gp130蛋白質：

(1) IL-6の存在下でIL-6レセプターと結合するがIL-6の非存在下ではIL-6レセプターと結合せず；そして

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において130kDaの見かけの分子量を示す；と特異的に結合し得る抗-gp130蛋白質抗体。

2. モノクローナル抗体である請求項1に記載の抗体。

3. ヒトインターロイキン-6のシグナル伝達に関与する gp130蛋白質との結合においてヒトインターロイキン-6レセプターと競合する、請求項2に記載の抗体。

4. AM64抗体である、請求項3に記載の抗体。

5. ヒトインターロイキン-6のシグナル伝達

に関与する gp130蛋白質との結合においてヒトインターロイキン-6レセプターと競合しない、請求項2に記載の抗体。

6. AM277抗体である、請求項5に記載の抗体。

7. ポリクローナル抗体である請求項1に記載の抗体。

8. 請求項2に記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

9. ヒトインターロイキン-6のシグナル伝達に関与する gp130蛋白質抗原により哺乳類を感作し、該哺乳類から免疫細胞を採取し、該免疫細胞をマエローマ細胞株と融合させ、そして該融合株から該 gp130蛋白質を認識する株をクローニングすることを特徴とするハイブリドーマの製造方法。

10. ヒトインターロイキン-6のシグナル伝達に関与する gp130蛋白質抗原が、固体キャリアーに結合された gp130蛋白質である、請求項9に記載の方法。

11. 請求項8に記載のハイブリドーマ、又は請求項9若しくは10に記載の方法により製造された

ハイブリドーマを培養し、該培養物からヒトインターロイキン-6のシグナル伝達に関与する gp130蛋白質を認識するモノクローナル抗体を採取することを特徴とする、抗-gp130蛋白質抗体の製造方法。

12. ヒトインターロイキン-6のシグナル伝達に関与する gp130蛋白質抗原により哺乳類動物を免疫感作し、該動物から該 gp130蛋白質を認識するポリクローナル抗体を採取することを特徴とする、抗-gp130蛋白質ポリクローナル抗体の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はヒトインターロイキン-6（以下「IL-6」と略す）のシグナル伝達に関与する蛋白質である gp130蛋白質と特異的に結合する抗体及びその製造方法に関するものである。

(従来の技術)

IL-6は、種々の重要な生理活性を有し、広く

存在下ではIL-6レセプターと結合せず、SDS/PAGEにおいて130kDaの見かけの分子量を有する蛋白質である。そしてIL-6がIL-6レセプターに結合後、細胞内にその情報を伝達するためには、IL-6がIL-6レセプターに結合しただけでは足りず、さらに細胞膜上の蛋白質である gp130蛋白質と会合しなければならないこと、さらにIL-6レセプターの細胞内領域はIL-6のシグナル伝達には関与しないことを明らかにした。

IL-6の生理的役割をさらに深く解析するためには、細胞内への情報伝達の経路に関する知見が重要である。そしてこのような知見は、IL-6作用を調節する物質を治療薬として開発するためにも重要である。しかしながら、gp130蛋白質の生体内での存在量は極めて微量であるので、大量の精製品を得るために遺伝子工学的手法を用いる必要がある。この様な遺伝子のクローニングの為には gp130蛋白質を迅速に同定できる抗 gp130蛋白質抗体の開発が望まれる。また、IL-6レセプターと gp130蛋白質の会合を競合的に阻止するモ

細胞の増殖分化に関与している蛋白質である。さらにIL-6の異常産生が種々の自己免疫疾患の病因子である可能性が報告されている（岸本、平野、Ann.Rev.Immunol., 6, p485, 1988年参照）。

IL-6と特異的に結合する細胞膜上のIL-6レセプターは、田賀らにより解析され、各細胞上の数、IL-6との結合定数等が報告されている（J.Exp.Med., 196, p967, 1987年参照）。さらにヒトIL-6レセプターのcDNAが山崎らにより単離され、一次構造が報告されている（Science, 241, 825, 1988年参照）。最近になり、IL-6レセプターの細胞外部分（可溶性レセプター）が、遺伝子工学的に作製され（特願平1-9774号明細書参照）、各種免疫疾患の治療薬、診断薬として期待されている。

さらに本発明者は、IL-6のシグナル伝達に関与する gp130蛋白質と呼称される蛋白質を細胞膜上に見出している（特願平1-200230号明細書参照）。即ち、この gp130蛋白質は、IL-6の存在下でIL-6レセプターと結合するが、IL-6の非

ノクローナル抗体が開発されれば、IL-6の生物活性を抑制する治療薬としての応用が可能である。

しかしながら、これまでにこの gp130蛋白質を認識するモノクローナル抗体は知られていない。

(発明が解決しようとする課題)

従って、本発明は gp130蛋白質に対する種々のタイプの抗体を提供しようとするものである。

(課題を解決するための手段)

上記の課題は、ヒトインターロイキン-6シグナル伝達に関与する次の性質を有する gp130蛋白質：

(1) IL-6の存在下でIL-6レセプターと結合するがIL-6の非存在下ではIL-6レセプターと結合しない；及び

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において130kDaの見かけの分子量を示す；と特異的に結合し得る抗-gp130蛋白質抗体；該抗体を生産するハイブリドーマ；該ハイブリドー

特開平3-219894(3)

マの製造方法；並びに該ハイブリドーマを用いる前記抗体の製造方法を提供することにより解決される。

(具体的な説明)

本発明の抗体は、ヒトIL-6のシグナル伝達に関する gp130蛋白質を特異的に認識するものであり、これにはモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体が含まれる。モノクローナル抗体には、ヒトIL-6レセプターと gp130蛋白質との結合を競合的に阻害するものと、これを競合的に阻害しないものとが含まれる。前者の例としては、本発明のハイブリドーマAM64により產生されるAM64モノクローナル抗体が挙げられ、後者の例としてはハイブリドーマAM277により產生されるAM277モノクローナル抗体が挙げられる。

本発明の抗体の製造のために用いられる免疫原としては、gp130蛋白質を細胞表面に発現している動物細胞を用いることができる。この様な細胞としてはヒトIL-6レセプター及び gp130蛋白質

の両者を產生するヒト由来細胞株、例えばヒトミエローマ細胞株U266、又は gp130蛋白質をコードするDNAにより形質転換された宿主細胞、例えばそのような動物細胞株が挙げられ、その例として gp130蛋白質をコードするcDNAを含有するプラスミドにより形質転換されたマウスT細胞が挙げられる。しかしながら、この様な細胞株は、細胞表面に発現している gp130蛋白質の量が少ない等のため効率的な免疫原とは言い難い。

しかしながら、この様な免疫原を使用してあっても、一旦 gp130蛋白質に対する抗体を手にすれば、これを用いてより効率的な免疫原を調製し、これを用いてさらに多様な抗体を製造することができる。例えば、gp130蛋白質に対する抗体を適当な固体担体に結合させ、他方、gp130蛋白質を產生する細胞、例えば前記の細胞を培養して細胞溶解し、この細胞溶解物を、前記の抗-gp130蛋白質抗体を結合した固体担体と接触せしめることにより細胞溶解物中の gp130蛋白質を担体上に吸着・濃縮して、これを免疫原として使用すること

ができる。固体担体については抗体を結合できるもので、免疫する動物の生育に重大な影響を及ぼさないものであれば特別の制限はない。例えば、本発明の実施例で説明される様なセファロース等を基材とした固体担体は、簡便な操作で抗体を結合でき、かつ、動物の生育に影響を与えない、等、本発明における固体担体として好適である。

また、gp130蛋白質の一部分を構成するペプチドを調製し、これを適当な高分子キャリヤー、例えばオバルブミンに結合して免疫原として使用することもできる。さらには、感染後に gp130蛋白質が発現するようにされたワクチンアウイルスを使用することもできる。これらの免疫原はいずれも、ポリクローナル抗体を製造するための免疫原として、及びハイブリドーマを調製するための免疫原として使用することができる。

ポリクローナル抗体の製造は、常法に従って、例えば上記のいずれかの免疫原によりマウス、ウサギ、ヒツジ、ヤギ等を免疫感作することによって行うことができる。

ハイブリドーマの作製も常法に従って行うことができる。例えば前記の免疫原のいずれかによりマウス等の哺乳類を免疫し、この動物から脾臓細胞を得、これを樹立されたミエローマ細胞と融合せしめる。次に、目的とする反応性を有するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマをクローニングする。

モノクローナル抗体を製造するには、前記のようにしてクローニングされたハイブリドーマを培養し、培養上清からモノクローナル抗体を採取する。あるいは、前記ハイブリドーマを動物の腹腔内に接種し、腹水を得、これからモノクローナル抗体を単離することもできる。ハイブリドーマ細胞上清中の抗体又は腹水中の抗体は、常法に従って、例えば硫酸アンモニウム塩析により濃縮することができ、さらにアフィニティークロマトグラフィー、例えば gp130蛋白質を固定化した担体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

上記のポリクローナル抗体の製造方法、ハイブ

リドーマの作製方法、モノクローナル抗体の調製方法、抗体の回収・精製方法は、いずれもそれ自身当業界によりよく知られている方法により行うことができる。

(実施例)

以下本発明をさらに詳細に説明するために実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1 gp130蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製

gp130蛋白質に対するマウスモノクローナル抗体を作製する目的で、免疫原として、ヒト gp130蛋白質を以下の方法で抽出した。

ヒトミエローマ細胞株U266の細胞 3×10^7 個を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の IL-6 と 37°C で 30 分間反応させて、該細胞上に存在する IL-6 レセプターと gp130蛋白質とを会合せしめた後、こうして形成された「IL-6 レセプター / gp130蛋白質」複合体を $1 \mu\text{g}$ の 1% ジギトニン（和光純薬製）、 10mM トリエタノ

ールアミンバッファー（pH 7.4）、 0.15M NaCl、 1mM pAPMSF（和光純薬製）で可溶化した。一方、プロムシアンで活性化したセファロース 4 B に、抗 IL-6 レセプター抗体である MT18 抗体（参考例：特願平1-186016号明細書参照）を常法に従って結合させた。これと前述の可溶化した細胞の上清を混合し、可溶化した IL-6 レセプターを樹脂上の MT18 抗体に、結合させることにより該 IL-6 を介して gp130蛋白質を結合させた。非特異的結合物を前述の 1% ジギトニン溶液で洗い流したのち、この樹脂を免疫原として用いた。

免疫およびハイブリドーマの作製は以下の様に行なった。前述した免疫原を 1 週間に 1 回、計 4 回、BALB/C マウスの腹腔内に免疫した。次にマウスからの脾細胞と、親株としてのミエローマ細胞株 P3U1 とを、ポリエチレングリコールを用いた通常の方法に従って融合させた。

スクリーニングは以下の様に行なった。まず、ハイブリドーマの上清と 0.01mg のプロテイン G セファロース（ファルマシア社製）を混合し、上清中

のイムノグロブリンを樹脂に吸着させた。一方、 ^{35}S メチオニンで内部標識した U266 細胞 1×10^7 個に $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の IL-6 を 37°C で 30 分間反応させた後、前述の MT18 抗体結合セファロース 4 B で ^{35}S 標識 IL-6 レセプター / gp130蛋白質複合体をアフィニティー精型した。これを前述のプロテイン G セファロースで通常の方法で免疫沈降させ、SDS/PAGE とオートラジオグラフィーで解析した。この結果、gp130 と特異的に結合する抗体を產生しているハイブリドーマが 1 クローン単離された。これを AM277 と命名した。また、このハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体を AM277 抗体と呼ぶこととする。

この AM277 抗体を用いてさらなる gp130蛋白質に対するモノクローナル抗体を次のように作製した。

U266 細胞 3×10^7 個を前述の 1% ジギトニン溶液で可溶化した。一方、プロムシアンで活性化したセファロース 4 B に AM277 抗体を常法に従って結合させた。これと前述の可溶化した細胞の超速

心上清を混合し、可溶化した gp130蛋白質を樹脂上の AM277 抗体に結合させた。非特異的結合物を前述の 1% ジギトニン溶液で洗い流した。そして、この樹脂を免疫原として、前述の AM277 と同様にして、ハイブリドーマの作製を行なった。

スクリーニングは次のように行った。まず、AM277 の場合と同様にハイブリドーマの上清中のイムノグロブリンをプロテイン G セファロースに吸着させた。一方、 ^{35}S メチオニンで内部標識した U266 細胞 1×10^7 個に $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の IL-6 を 37°C で 30 分間反応させた後、前述の AM277 抗体結合セファロース 4 B で、 ^{35}S 標識 gp130蛋白質を精製した。これを前述のプロテイン G セファロースで通常の方法で免疫沈降させ、SDS/PAGE とオートラジオグラフィーで解析した。この結果、gp130蛋白質と特異的に結合する抗体を產生しているハイブリドーマが 1 クローン単離された。これを AM64 と命名した。また、このハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体を AM64 抗体と呼ぶこととする。これらのハイブリドーマ AM64 及

びAM277は、工業技術院微生物工業技術研究所にそれぞれ微研菌寄第11194号(FERM P-11194)及び微研菌寄第11195号(FERM P-11195)として寄託されている。

AM64抗体及びAM277抗体がgp130蛋白質を特異的に認識して免疫沈降させることを確認するため、内部標識されたU266細胞をディタージェントで可溶化後、AM64抗体又はAM277抗体で免疫沈降し、SDS/PAGE、オートラジオグラフィーを行った。その結果を第1図に示す。

この結果、AM64抗体及びAM277抗体がgp130蛋白質を特異的に認識することが確認された。

実施例2 AM64抗体が gp130蛋白質の細胞外部分を認識していることの確認

細胞膜上に表出している抗原を蛍光染色する方法を用いて、AM64抗体がgp130蛋白質の細胞外部分を認識するか否か確認した。

前述のU266細胞とAM64抗体を混合し、細胞膜上のgp130蛋白質に結合したAM64抗体を蛍光(FITC)標識された抗マウスイムノグロブリン抗体(FITC

anti-mIg)で蛍光染色した。

第2図は、AM64抗体がU266細胞に表現されているgp130蛋白質の細胞外部分に結合することを示す。即ち、第2図において、ⅡはU266細胞にAM64抗体を反応させた後、細胞膜上に結合したAM64抗体を前述のFITC anti-mIgで蛍光染色した時の細胞の蛍光強度分布を示す。培地のみの対照を表すⅠと比較すると蛍光強度が強い方にシフトしており、この結果、AM64抗体がgp130蛋白質の細胞外部分を認識していることが確認された。

実施例3 AM64抗体の認識部位が gp130蛋白質の IL-6レセプターとの会合部分であることの確認

実施例2と同様の方法を用いて、AM64抗体の認識部位がgp130蛋白質のIL-6レセプターとの会合部分であることを確認した。

即ち、U266細胞をIL-6で刺激して、該細胞上のIL-6レセプターとgp130蛋白質とを会合させた後、AM64抗体をさらに混合し、前述のFITC anti-mIgで蛍光染色した。その時の細胞の蛍光強

度を第2図にⅢとして示す。このⅢをⅡと比較すると、AM64抗体のgp130蛋白質への結合がIL-6の刺激により、即ちIL-6レセプターとgp130蛋白質との会合により阻害されることが確認できる。

次に、AM64抗体がIL-6により誘導されるIL-6レセプターとgp130蛋白質との会合を阻害しうるか否かを次の様に確認した。¹²⁵Iで細胞表面標識したU266細胞浮遊液にAM64抗体とIL-6を同時に加えることにより、IL-6の存在下でU266細胞上のgp130蛋白質への結合についてAM64抗体と該細胞上のIL-6レセプターとを競争せしめた。

このU266細胞を1%ジギトニン溶液で可溶化して、その上清を実施例1と同様にMT18抗体で免疫沈降させ、SDS/PAGEで解析した。その結果を第3図にレーン2として示す。同様の実験をAM64抗体の非存在下で行った結果を第3図レーン1に示す。レーン1においては130kDa及び80kDaの位置の両方にバンドが検出され、このことはgp130蛋白質(分子量130kDa)と会合したIL-6レセプター(分子量80kDa)(いずれも¹²⁵Iにより標識され

ている)がMT18抗体により沈降したことを示している。これに対して、レーン2においては130kDaの位置のバンドの濃さが顕著に減少しており、このことはIL-6レセプター(分子量80kDa)はMT18抗体により沈降するが、AM64抗体の存在によりgp130蛋白質とIL-6レセプターとの会合が阻害されたことを意味する。

同様の操作をAM277抗体について行なった。その結果は第3図にレーン3として示す。この結果、AM277抗体はIL-6レセプターと、gp130蛋白質との会合を阻害しないことを示している。

実施例4 AM64抗体がIL-6の機能を阻害することの確認

S.Shimizuらの方法に従うIL-6依存性のヒトT細胞白血病株KT-3の増殖試験(Blood, 72(5), p1826, 1988)によって、AM64抗体がIL-6の機能を阻害するか否か確認した。即ち、 1×10^4 個のKT-3細胞をIL-6(50pg/ml)存在下で、 5×10^4 細胞/mlにて72時間培養した。この時AM64抗体を40μg/mlの濃度で添加した。培養の最後24

時間に ^3H -チミジン ($0.5 \mu\text{Ci}$) を添加し、培養後KT-3細胞に取り込まれた放射能を測定した。また、AM64抗体にかえてAM277抗体を添加し、同様にして増殖試験を行った。

これらの結果は、第4図に示す通りである。この結果、AM277抗体がIL-6によるKT-3細胞の増殖を阻害しないのに対し、AM64抗体はその増殖を阻害することが確認された。

更に、T.Hiranoらの方法に従うSKW6-CL4細胞株のIL-6依存性 IgM抗体産生增强を見る方法 (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,82,p5490,1985年) によって、AM64抗体がIL-6の機能を阻害するか否か確認した。即ち、 1×10^4 個のSKW6-CL4細胞をIL-6 (200pg/mg) 存在下で、 5×10^4 細胞/mgにて72時間培養した。この時、AM64抗体またはAM277抗体を5mg/mgの濃度で培養液に添加した。培養後、上清中に含まれるIgM抗体を酵素抗体法によって測定した。

結果は第5図に示す通りである。この結果、AM277抗体がIL-6によるSKW6-CL4細胞株からの

IgM抗体産生を阻害しないのに対し、AM64抗体はその産生を阻害することが確認された。

参考例. ヒトIL-6レセプターに対するマウスモノクローナル抗体の製造

ヒトIL-6レセプターに対するマウスモノクローナル抗体を作製する目的で、免疫原として、ヒトIL-6レセプターを膜面に発現しているマウスT細胞株を以下の方法で作製した。すなわち、特願平1-9774号明細書に記載されているpBSF2R, 236 及びpSV2neoをマウスT細胞株CTLL-2(ATCC, TIB214)に常法で導入し、G-418を用いる通常の方法でスクリーニングをし、最終的にIL-6レセプターを細胞あたり約30,000個発現している株を樹立し、これをCTBC3と名づけた。

免疫は以下の様に行った。RPMI1640を用いる通常の方法で培養後、PBSバッファーで4回洗浄したCTBC3を、C57BL6マウス1匹あたり 1×10^7 細胞個、1週間に1回で計6回、腹腔内に免疫した。

前記免疫されたマウスからの脾細胞を、親株と

してのミエローマ細胞系P3U1と、ポリエチレンギリコールを用いる通常の方法に従って融合せしめた。

スクリーニングは以下の様に行った。IL-6レセプター陰性のヒトT細胞株JURKAT(ATCC, CRL8163)に、pBSF2R, 236とpSV2neoを常法で導入し、スクリーニングの結果、IL-6レセプターを細胞あたり約100,000個発現している株を樹立し、これをNJBC8と名づけた。NP40で可溶化したNJBC8を認識し、NP40で可溶化したJURKATを認識しない抗体を產生しているハイブリドーマが1クローン単離され、これをMT18と名づけた。また、このハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体をMT18抗体と称する。前記のハイブリドーマMT18は、工業技術院微生物工業技術研究所に微生物研菌寄第10840号(PERM P-10840)として寄託されている。

[発明の効果]

本発明で提供されるsp130蛋白質を特異的に認

識するモノクローナル抗体は、診断薬、治療薬としての利用が期待されるIL-6のシグナル伝達に関与するsp130蛋白質を、大量に生産し、精製するに有益である。

また、本発明によって提供される抗体を用いることにより、これまでに知られていない種々の細胞が有するであろうsp130蛋白質の諸性質を解析することが可能になる。このことは、個体発生、免疫機構の研究、さらにはこれらの成果に基づく治療薬、診断薬等の開発等に大きな意義をもつ。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、内部標識されたU266細胞をディテージェントで可溶化後、AM64抗体又はAM277抗体で免疫沈降し、SDS/PAGE及びオートラジオグラフィーを行った結果を示す。

第2図は、U266細胞膜上に結合したAM64抗体をFITC標識抗マウスイムノグロブリン抗体で蛍光染色した時の蛍光強度分布を示す。図中、ⅠはAM64抗体を含まない培地のみの対照、ⅡはAM64を反応させたとき、及びⅢはIL-6をあらかじめ反応さ

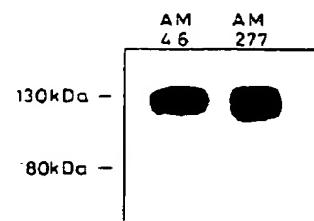
せさらにAM64抗体を反応させたときの蛍光強度分布をそれぞれ示す。

第3図は、内部標識されたU266細胞を、IL-6で刺激し（レーン1）、AM64抗体存在下にIL-6で刺激し（レーン2）、またはAM277抗体存在下にIL-6で刺激し（レーン3）、その後細胞をジギトニンで可溶化し、MT18抗体で免疫沈降し、

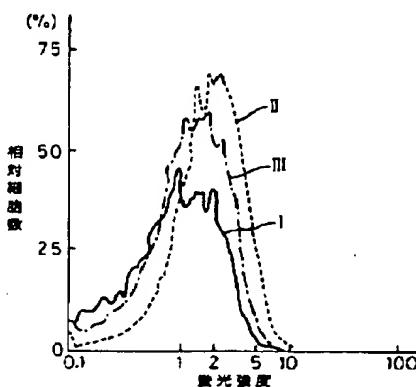
SDS/PAGE及びオートラジオグラフィーを行った結果を示す。

第4図は、IL-6によるMT-3細胞の増殖に対するAM64抗体及びAM277抗体の阻害効果を示す。

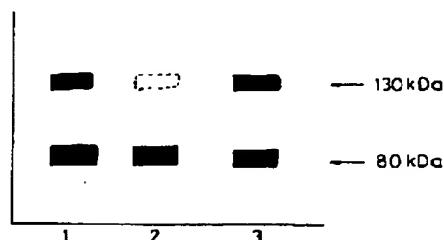
第5図は、IL-6によるSKW6-CL4細胞からのIL-6M産生に対するAM64抗体及びAM277抗体の抑制効果を示す。



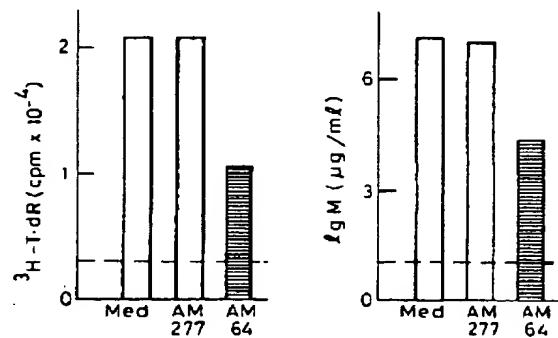
第1図



第2図



第3図



第4図

第5図

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)9月8日

【公開番号】特開平3-219894

【公開日】平成3年(1991)9月27日

【年通号数】公開特許公報3-2199

【出願番号】特願平2-15090

【国際特許分類第6版】

C12P 21/08

C07K 14/47

16/18

C12N 5/10

15/02

// A61K 39/395

【F I】

C12P 21/08

C07K 14/47

16/18

A61K 39/395 D

U

C12N 15/00 C

5/00 B

手続補正書

平成8年12月11日

特許庁長官 虎井寿光國

1. 事件の表示

平成2年特許第15090号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

氏名 岸本忠三

3. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目3番1号 虎ノ門37ビル

育和特許法律事務所 電話 03-5470 1800

氏名 弁理士(7751)石田 敏

4. 補正の対象

(1) 明細書の「明細の詳細な説明」の欄

(2) 図面

5. 補正の内容

(1) 明細書第4頁第8行目、「196」を「166」に補正します。

(2) 同第16頁第2行目、「表現」を「表現」に補正します。

(3) 同第10頁第4行目、「0226細胞」を「0206細胞」に補正します。

(4) 同第17頁第10行目、「MA64抗体」を「AM64抗体」に補正します。

(5) 同第20頁第17行目、「C57BLマウス」を「C57BL/6マウス」に補正します。

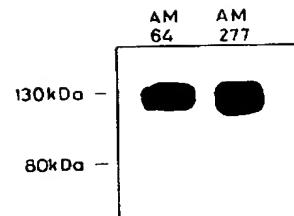
(6)

(7) 第1図及び第5図を別紙の通りに補正します。

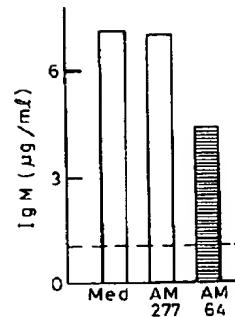
6. 添付書類の目録

図面(第1図及び第5図)

1通



第1図



第5図